

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2016.11.038

# 麻疯树异戊烯基焦磷酸异构酶基因(IPI) 启动子的克隆及瞬时表达分析

胡晓乐, 张敏, 田银帅, 徐莺, 陈放

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

**摘要:** 本文以麻疯树基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到麻疯树异戊烯基焦磷酸异构酶 (IPI) 基因 (*JcIPI*) 起始密码子上游 1 536 bp 的启动子序列. 利用在线软件 PLACE 和 PlantCARE 分析表明该序列除具备 TATA-Box、CAAT-Box 等启动子基本元件外, 还含有 AuxRR-core、TATC-box、MBS、HSE 等特异性元件. 为确定启动子核心启动区域, 构建 *JcIPI* 启动子 283、550、970、1 276 和 1 536 bp 的 5' 端缺失片段, 并将其分别驱动 pBI121 载体的葡萄糖苷酸酶 (GUS) 基因, 构建植物表达载体. 采用农杆菌介导法转化烟草, 在烟草叶片中进行瞬时表达分析. GUS 酶活测定结果显示, 五个启动子缺失片段都具有启动子活性, 并随长度增加而增强.

**关键词:** 麻疯树; 异戊烯基焦磷酸异构酶; 启动子; 瞬时表达

**中图分类号:** Q78      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0490-6756(2016)06-1409-06

## Cloning and transient expression analysis of isopentenyl diphosphate isomerase gene (IPI) promoter from *Jatropha curcas*

HU Xiao-Le, ZHANG Min, TIAN Yin-Shuai, XU Ying, CHEN Fang

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract:** In order to study the expression and regulation of isopentenyl diphosphate isomerase (IPI) gene in the terpenoid biosynthesis pathway of *Jatropha curcas*, a 1536bp promoter fragment of IPI gene was cloned by PCR method. The bioinformatics analysis showed that the fragment contained the conserved promoter sequence, such as TATA-box, CAAT-box. Furthermore, it contained several elements related to auxin response, gibberellin response, disease-related and high temperature. To determine the optimal promoter sequence for gene expression, IPI gene promoter was deleted from its 5' end to form promoter fragments with 283, 550, 970, 1276 and 1536bp. Such fragments were fused to a  $\beta$ -glucuronidase (GUS) gene. The fused genes were transformed into *Nicotiana benthamiana* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method for transient expression. GUS quantitative fluorometric assays demonstrated that the five different length fragments of the promoter had promoter activities and the activities were increased with the deleted length of promoters.

**Keywords:** *Jatropha curcas*; Isopentenyl diphosphate isomerase; Promoter; Transient expression

收稿日期: 2016-03-21

基金项目: 国家“十二五”重大科技支撑计划课题(2011BAD22B08)

作者简介: 胡晓乐(1989-), 女, 河南洛阳人, 硕士研究生, 主要研究领域为植物生理与分子生物学, E-mail: huxiaole901230@163.com

通讯作者: 陈放, E-mail: fangchenscu@163.com

## 1 引言

启动子是位于结构基因 5' 端上游能与 RNA 聚合酶发生特异性识别以及结合的一段 DNA 序列,目前,常用 5' 端缺失分析来确定启动子的功能区域.此方法将 PCR 扩增获得的不同长度的 5' 启动子缺失片段与报告基因连接,构建植物表达载体,再转化受体(烟草或拟南芥),通过检测报告基因的瞬时表达情况从而确定启动子不同缺失片段的启动活性.

麻疯树为大戟科麻疯树属灌木或小乔木,广泛分布于热带和亚热带地区.萜类化合物是麻疯树中主要的有活性的次级代谢产物.目前,已从麻疯树中分离鉴定出至少 25 种萜类化合物.这些成分具有抗肿瘤、抗 HIV、抑菌、杀虫、抗氧化等多方面的药理活性<sup>[1]</sup>.然而麻疯树中对动物有毒性的一些萜类物质(如佛波酯)的存在使高蛋白的麻疯树种子饼粕不能作为动物饲料,极大的降低了麻疯树的综合利用率<sup>[2]</sup>.因此,利用基因工程技术,对麻疯树萜类生物合成的代谢网络进行调控,有利于麻疯树产业的可持续发展.

所有的萜类物质都是由异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)与其异构体二甲基丙烯基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)缩合而成<sup>[3]</sup>.异戊烯基焦磷酸异构酶(IPP isomerase, IPI/IDI, EC 5.3.3.2)催化 IPP 与 DMAPP 之间的可逆转化反应,是整个萜类代谢网络的一个枢纽<sup>[4]</sup>.因此 IPI 被认为是萜类生物合成调控途径的关键酶<sup>[5]</sup>.迄今为止, IPI 基因已从拟南芥<sup>[6]</sup>、喜树<sup>[7]</sup>、番茄<sup>[8]</sup>、杜仲<sup>[9]</sup>和曼地亚红豆杉<sup>[10]</sup>等许多植物中分离.研究表明, IPI 基因的超量表达利于代谢流向下游流动,促进下游相关产物的生物合成.目前, Wei 等<sup>[11]</sup>从麻疯树中克隆并初步研究了麻疯树 IPI 基因的功能,但其启动子功能研究至今尚未见报道. IPI 作为麻疯树萜类生物途径的关键酶,分析并验证其启动子序列与功能有助于明确 IPI 基因在整个麻疯树萜类合成途径中的地位.本研究扩增出 IPI 基因的启动子全长及 4 个不同长度的 5' 端缺失片段,分析其序列结构并分别用于驱动葡萄糖苷酸酶( $\beta$ -glucuronidase, GUS)基因,构建植物表达载体,并通过瞬时表达对该启动子的启动活性进行初步分析,为进一步研究 IPI 基因功能及其在麻疯树萜类生物合成途径中的调控机制提供理论依据.

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

用于提取基因组 DNA 的麻疯树(*Jatropha curcas* L.)植株、烟草(*Nicotiana benthamiana*)、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ (*Escherichia coli*)、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)GV3101 和 pBI121 质粒载体由本实验室保存.

pMD19-T 试剂盒,植物总 DNA 提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司;BCA 蛋白定量分析试剂盒为 Thermo 公司产品;PrimeSTAR Max DNA Polymerase、DNA 限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam* H I 为 TaKaRa 公司产品;引物由北京六和华大生物科技有限公司合成;其他所用化学药品均为国产或进口分析纯试剂.

### 2.2 方法

2.2.1 IPI 基因启动子的克隆 以麻疯树叶片为材料提取基因组 DNA,并以 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA.根据已克隆的 IPI 基因的 cDNA 序列,登录麻疯树基因组数据库(<http://www.Kazusa.or.jp/jatropha/>)进行检索,获得 IPI 基因 ATG 上游约 1 600 bp 的启动子序列.用引物设计软件 Primer 5.0 设计引物(表 1),扩增不同长度的 IPI 基因启动子 5' 片段.以麻疯树基因组 DNA 为模板,用 IPI-P1536 和 IPI-PR 特异性引物扩增获得 IPI 基因启动子的全长序列.所用 PCR 扩增体系(50  $\mu$ L)为:纯化的 DNA 模板 2  $\mu$ L, 2 $\times$ Prime Star Mix 25  $\mu$ L, IPI-P1536 2  $\mu$ L (10  $\mu$ mol  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>), IPI-PR 2  $\mu$ L (10  $\mu$ mol  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>), ddH<sub>2</sub>O 19  $\mu$ L;扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存.

将 PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测并切胶回收.将胶回收产物与 pMD19-T 克隆载体连接,并将连接产物用热激法转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞.转化后的细胞涂布于氨苄(Amp)抗性的 LB 固体培养基(50  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>), 37 $^{\circ}$ C 过夜培养 12 h 取克隆单菌落于 Amp 抗性的 LB 培养液体基中, 37 $^{\circ}$ C 摇床震荡培养 2 h 后菌液 PCR 验证.菌液 PCR 验证的阳性克隆菌株于成都擎科生物公司测序.提取测序正确的菌株的质粒,以其为模板,用 IPI-P283F、IPI-P550F、IPI-P970F、IPI-P1276F 与 IPI-PR 分别配对的 4 对引物进行 PCR,扩增 IPI 基因启动子的缺失片段. PCR 扩增体系和程序与

表1 克隆 *JcIPI* 启动子的引物Tab. 1 Primers for cloning *JcIPI* promoter

引物名称	引物序列	酶切位点
IPI-P283F	5'-CCCAAGCTTTCTTGATAAACTTTGACTAAAACCTA-3'	<i>Hind</i> III
IPI-P550F	5'-CCCAAGCTTAAATGCTATACTCTCACGGTTC-3'	<i>Hind</i> III
IPI-P970F	5'-CCCAAGCTTAATTTGACTGAATGCTTTTGG-3'	<i>Hind</i> III
IPI-P1276F	5'-CCCAAGCTTTCAGGTCCAAGCAATGATG-3'	<i>Hind</i> III
IPI-P1536F	5'-CCCAAGCTTACTCTAAATGACAGCCATCGG-3'	<i>Hind</i> III
IPI-PR	5'-CGGGATCCTTTTCCTCTT TTTTGTTTTATGTTT-3'	<i>Bam</i> H I

下划线表示在上游和下游引物的5'端所引入的 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶切位点

IPI 基因启动子全长序列扩增条件相同. 缺失启动子片段扩增后同样连接克隆载体并进行测序验证.

2.2.2 启动子序列分析 使用植物顺式作用元件数据库 PlantCARE (<http://bioinformatic.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 及 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) 分析启动子序列, 获得 IPI 基因启动子的顺式作用元件信息.

2.2.3 IPI 基因启动子表达载体的构建 从测序正确的阳性菌株中提取含有不同目的片段的质粒, 用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切回收目的片段. 将目的片段分别与 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切回收的 pBI121 载体片段连接, 转化大肠杆菌, 菌液 PCR 及质粒酶切鉴定筛选阳性克隆, 获得重组载体 pBI121-P283、pBI121-P550、pBI121-P970、pBI121-P1276、pBI121-P1536.

2.2.4 农杆菌介导转化烟草 采用热激法把构建好的 5 个启动子表达载体转化到根癌农杆菌 GV3101 感受态细胞中, 转化后的细胞涂布于卡那 (Kan) 和利福平 (Rif) 抗性的 LB 固体培养基 ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $28^\circ\text{C}$  培养 48 h. 挑取单克隆菌落, 菌液 PCR 验证获得阳性菌株. 将已鉴定的农杆菌单克隆接种到 5 mL 含抗生素的 LB 液体培养基  $28^\circ\text{C}$  培养 20 h 后, 加至 50 mL 培养基 ( $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酰丁香酮),  $28^\circ\text{C}$  培养至  $A_{600} = 0.5$ . 将菌液  $4000 \text{ r/min}$  离心 10 min, 用 10 mL 缓冲液 ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化镁,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  MES,  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酰丁香酮) 重悬至  $A_{600} = 0.8$ , 室温放置 3 h. 以 1 mL 无菌医用注射器吸取菌液, 将菌液从下表皮缓缓注射进叶片中, 48 h 后注射叶片从烟草植株上取下<sup>[12]</sup>, 注射实验重复 3 次. 将叶片在液氮中迅速研磨成粉末, GUS 酶荧光活性测定参照 Jefferson 等<sup>[13]</sup> 的方法进行, 取  $40 \mu\text{L}$  的 GUS 蛋白提

取液于反应液中,  $37^\circ\text{C}$  孵育下用速率法测定反应的初速度. 另取  $40 \mu\text{L}$  的 GUS 蛋白提取液用 BCA 蛋白定量分析试剂盒测定样品的蛋白含量. GUS 酶活性以酶和底物反应的初速度与样品蛋白含量的比值表示.

### 3 结果

#### 3.1 IPI 基因启动子的克隆

用特异引物以麻疯树基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增获得一条长度约为 1 600 bp 的特异性条带 (图 1), 与预期大小一致. 目的片段切胶回收纯化后, 与 pMD19-T 载体连接, 菌液 PCR 获得阳性菌株. 测序结果显示该片段全长 1 536 bp, 与麻疯树基因组数据库比对完全正确. 以 pMD19-T-P1536 质粒为模板, 用 4 个缺失特异引物扩增获得 4 个启动子缺失片段, 结果见图 1.

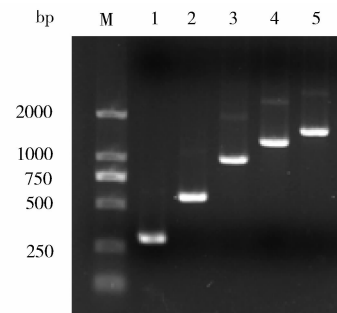


图1 麻疯树 IPI 启动子的 PCR 扩增  
M: DNA Marker(DL2000); 1~5: 不同长度 5'缺失片段

Fig. 1 Amplification of *JcIPI* promoter

#### 3.2 IPI 基因启动子序列分析

使用植物顺式作用元件数据库 PlantCARE 及 PLACE 对 IPI 基因启动子进行顺式作用元件预测. 结果如表 2 和图 2 所示, IPI 基因启动子中含有 TATA-box、CAAT-box 等绝大多数真核生物启动

子所具有的调控转录起始和转录频率的保守序列元件. 除此之外, 启动子序列中还具有多个与激素、生物胁迫及非生物胁迫相关调控元件. 激素响应调控元件主要包括: 生长素响应调控元件 AuxRR-core, 乙烯响应元件 ERE, 赤霉素响应调控元件 P-

box 和 TATC -box, 水杨酸响应元件 TCA-element; 生物胁迫相关调控元件有: 病原菌诱导有关的原件 W box; 非生物胁迫调控元件主要包括: 干旱响应元件 MBS, 高温响应元件 HSE.

表 2 IPI 基因启动子所含的顺式作用元件

Tab. 2 The cis-acting elements in IPI gene promoter

元件名称	序列	位置 bp	元件功能	数量
AuxRR-core	GGTCCAT	-84	生长素响应元件	1
ERE	ATTTCAAA	-633	乙烯响应元件	1
P-box	CCTTTTG	-1003	赤霉素响应元件	1
TATC-box	TATCCCA	-920	赤霉素响应元件	1
TCA-element	GAGAAGAATA	-1119; -1310	水杨酸响应元件	2
Box-W1	TTGACC	-356	真菌诱导子响应元件	1
W box	TTGACC	-356	与病原菌和伤口诱导有关	1
MBS	CAACTG	-1260	干旱响应元件	1
HSE	AAAAAATTTTC	-333	高温响应元件	1

```

-1382 TACTCTAAATGACAGCCATCGGATTGGATCAGCTGTACAGATGCTAATCCAAGGGACCTAAATTATCTT
-1312 CTAGATTATGGGAATCTGCAGATGATTTCAATTTATTGACATCTCACAACTGCTTATGCACCTAACTCT
水杨酸相关调控元件 干旱响应元件
-1242 AATGAAAACCTGACTCAATTTAAAAGAAATATGTTAGCAAGGTAAAGTATAACTTCTGATTTAACACCTT
胚乳特异性表达元件
-1172 TGGATCTTTGCTTATGTTTTGTTATTACAGTACCTTCTATATTTTTCCTTTTTCAGGTCCAAGCAATGATGA
水杨酸相关调控元件
-1102 ACACGCACAAAAGCAGTATGTATTTGATGCAATAAAACAATAACAAATACAAATGTACAGTATACTGGTT
-1032 TAGACATTGACATGTATAAGACAAAAGGCAGTATATTAGTGCAAATGAAATAAGAAAGAAATATATTTTAT
赤霉素调控相关元件
-962 GTCAGGCTTGAATTGAGTGAAGGTGATTCATCCTCTTGGGATAGGATTTTAGTCTTGTATGTATATATAT
赤霉素响应调控元件
-892 ATTTTATTGACATAAAACAATGAGAAAAATTTGGTAGCAGAGATGCAGTGTCTTTGTTGACTCTGGAAGAGG
CAAT-box1
-822 ATGCCAAATTTGACTGAATGCTTTTGGTTTTTGGCCTACTTTGGGGTTGTTAACTTGTACTAGCAGCGG
-752 CAAAAATTTAATGGCTATATTTGTGGGCAAAAGTCTATACCTTTGCATTTTCAAAGTTAGACATTTTAAAG
-682 GTAATACTCACTCGATCTCATTATATTTGCTTGTTATTTCTTTTGGAAATATTGCAAGATTTTAAAT
乙烯相关调控元件
-612 TATATATTTAAATGATTATTTTTTCGAGAATCATATCTATGATTATTTATTAATAAATGATTTTTATTA
-542 ATATCTTAATGAGTAAAAGATAAAAATGATAAATAATTTTATTGACTAAATTTTAAATATATGTATTTTG
-472 TCAAACCATATAAATAAATTTGGGACGGAAAAAATATTATATTAGATAAAATTTGCAAAATAAGGGATAGA
-402 AAAGGGAAATGTATACTCTCACGGTTCATTAAGTGAAAATTTTGACCACAAAATATCATGGAAAATTTTTT
与病原菌和伤口诱导有关元件 高温响应元件
-332 AAAATTTTATCTTATAAAACAATGATTTTTTCTTTTTTTTTTAAATTTAGCCTCCTTTACCTTAATTTT
CAAT-box1
-262 TTAGACAGTCTCCATCTCTACCCTAATAAATAAGGGATTAATAATCTTACAATATCTTATAATAACA
CAAT-box1
-192 AAAGATTGTGTATATATATAAAAAAATCATATCGAGATATTCATACTTGTAAATACAACAAATCTTGTA
TATA-box4
-122 AAACCTTGACTAAAACCTAAAACCTAGTAATAAAACAATTAATTTAGTGGGTCCATCACATATTTTTTAAT
CAAT-box1 生长素响应元件 TATA-box
+1
-52 TGTAATCCTAATTAAGCAAATTACCAAATATCAAAGATTGCCAAATACCTATTAAAATCAATAATCAA
TSS转录起始位点 CAAT-box1
+19 AATTGCATAAGAATCACAAGTTAAAGAAAAAATAAATGCTTCCATTCATAAATTCGCGGATACTTCCAC
+89 AACCCATATATACACTTCCAAGTAATTGGAAAAATATATTAACATAAAACAAAAAGAGAAAAATG
翻译起始位点

```

图 2 IPI 基因启动子序列

Fig. 2 The promoter sequence of IPI gene

### 3.3 IPI 基因启动子及缺失片段植物表达载体的构建及工程菌的制备

将获得的 4 个启动子缺失片段分别连接克隆载体 pMD19-T, 转化 DH5 $\alpha$ , 菌液 PCR 获得阳性克隆,

测序正确后提取质粒. 目的片段分别定向替换植物表达载体 pBI121 的 CaMV3 5S 启动子, 通过双酶切、连接、转化 DH5 $\alpha$ , 菌液 PCR 并双酶切验证(图 3), 成功构建了 IPI 基因启动子的缺失片段表达载

体(图 4). 选用 pBI121 载体作为阳性对照, 采用热激法, 将 pBI121 载体和 5 个不同长度的启动子表达载体转化至根癌农杆菌 GV3101 感受态细胞中, 菌落筛选并经菌液 PCR 检测, 获得阳性克隆菌株.

### 3.4 IPI 基因启动子不同长度片段在烟草中的瞬时表达表达活性分析

目前对克隆启动子的活性检测主要是采用瞬时表达的方法, 该法简单快捷, 周期短. 基于这些特点, 将构建好的 5 个植物表达载体转化烟草并进行 GUS 荧光定量分析. 结果显示不同长度的 IPI 基因启动子片段都能驱动 GUS 报告基因表达, 但均显著低于 CaMV35S 启动活性. 这表明该启动子具有启动下游基因表达的基本元件, 能够驱动下游基因的表达.

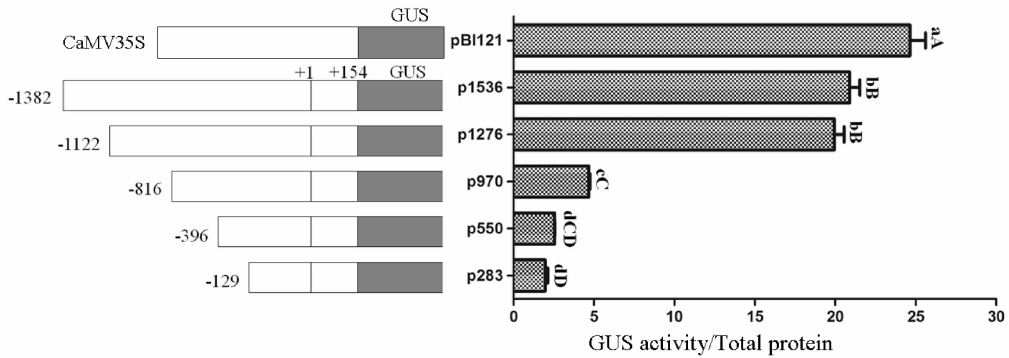


图 4 不同 IPI 启动子植物表达载体构建示意图及其 GUS 活性荧光定量分析  
Fig. 4 Construction of different plant expression vectors of IPI promoter and their GUS quantitative fluorometric assays

条形图中不同大小写字母分别表示处理间在 0.01 和 0.05 水平差异

启动子片段 P1536 与 P1276 相比在  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  下均没有差异, 说明 -1 382 bp 至 -1 122 bp 之间的启动子片段中可能没有影响启动子活性的顺势作用元件. 而缺失 -1 122 bp ~ -816 bp 片段则导致启动子活性显著下降, GUS 荧光定量数据显示 P970 启动子活性仅为 P1276 启动活性的 23.45% (图 4). 这说明在 IPI 基因启动子中, 位于 -1 122 bp ~ -816 bp 的区段中可能存在决定启动子启动活性正调控的顺式作用元件, 对启动子的启动活性起至关重要的作用. 启动子片段 P550 的启动活性显著低于 P970, 但是与 P283 相比没有显著性差别, 这表明 -816 bp ~ -396 bp 之间可能存在增强启动活性的顺式作用元件, 而 -396 bp ~ -129 bp 之间可能没有. 另外, 由于启动子片段 P283 仍有较弱的启动活性, 这说明该片段中可能存在 IPI 基因启动子的核心启动区.

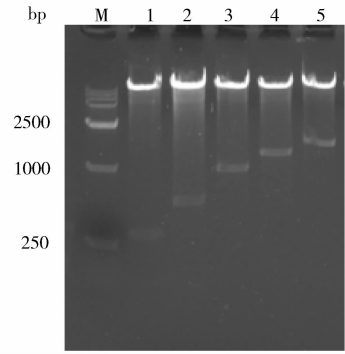


图 3 缺失表达载体的 *Hind* III 和 *Bam* H I 双酶切检测

M: DNA Marker (DL15000); 1-5: 5' 缺失片段表达载体  
Fig. 3 Double enzyme digestion of expression vectors using *Hind* III and *Bam* H I

## 4 讨论

IPI 作为麻疯树萜类生物合成途径的关键限速酶, 对调控麻疯树萜类合成起着至关重要的作用, 而启动子则精确调控着植物体内基因的表达. 本研究成功克隆出麻疯树 IPI 基因起始密码子上游 1 536 bp 的启动子序列. 分析发现该启动子含有大量的顺式作用元件(图 2 和表 2). 在拟南芥中和番茄中, *AtIPI* 和 *SlIPI* 基因在根中的表达量远高于其在叶中的表达量<sup>[6,8]</sup>. 在麻疯树中, *JcIPI* 基因只在叶、花和种子中表达, 且在花中的表达量远高于其在叶和种子中的表达<sup>[11]</sup>. 丹参 *SmIPI* 基因在生物诱导剂 (100 mg · mL<sup>-1</sup> 酵母提取物) 和非生物诱导剂 (30 mmol · L<sup>-1</sup> Ag<sup>+</sup>) 共同诱导 12 h 后的表达量达到最高, 随后逐渐下降<sup>[14]</sup>; 在麻疯树 IPI 基因启动子序列中也发现了与真菌诱导子、病原体侵入有关的顺式作用元件 W box、Box-W1 和

MBS, 这似乎预示着麻疯树 IPI 基因可能在对抗入侵病原体 and 真菌诱导子的过程中发挥作用, 但还有待于进一步的实验验证. 此外, 棉花 *GbIPI* 的表达受茉莉酸甲酯、水杨酸诱导<sup>[15]</sup>; Wei 等<sup>[11]</sup> 发现在麻疯树中, 盐、干旱和茉莉酸甲酯均能诱导 IPI 基因的表达. 相应的, 在麻疯树 IPI 基因启动子中还发现有多种与激素及非生物胁迫有关的调控元件, 说明 IPI 基因参与麻疯树逆境应答响应.

构建驱动 GUS 报告基因的植物表达载体, 农杆菌介导法转化烟草并进行瞬时表达, GUS 荧光定量检测发现, IPI 基因启动子缺失片段均具有启动活性, 可以驱使下游 GUS 基因的表达, 随着缺失片段长度的增加, 其启动子的活性也随之增强. 其中 P1276 和 P1536 的启动子缺失片段启动活性较强, 分别为 CaMV35S 启动子的 80.92% 和 84.76%, 而 P283、P550、P970 的启动子片段启动活性则为 CaMV35S 启动子的 7.94%、10.30%、18.97%. 短启动子片段与长启动子片段启动活性存在较大差异, 可能是由于启动子某区段内含有与正调控相关的顺式作用元件, 该区段的缺失将导致下游结构基因的表达水平下调. 长度为 1 276 bp 的启动子缺失片段具有较强的启动子活性, 可为进一步开发短片段启动子提供重要参考.

本研究通过克隆麻疯树萜类生物合成途径中关键酶 IPI 基因的启动子并构建驱动 GUS 报告基因的植物表达载体, GUS 荧光定量结果表明该序列具有启动活性, 为进一步探究麻疯树异戊烯基焦磷酸异构酶的生物学功能提供了重要的依据, 也为将来深入解析麻疯树萜类合成途径并调控其代谢网络奠定基础. 为进一步探究麻疯树 IPI 基因启动子的功能与特性, 需获得稳定表达的转基因植株. 我们下一步的研究重点是探索麻疯树 IPI 基因启动子中重要作用元件与相关转录因子的互作.

#### 参考文献:

- [1] Devappa R K, Makkar H P S, Becker K. *Jatropha* diterpenes: a review[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2011, 88(3): 301.
- [2] Makkar H P S, Becker K. Are *Jatropha curcas* phorbol esters degraded by rumen microbes [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(9): 1562.
- [3] Nobuaki S, Hirota U, Takashi N, *et al.* Construction and analysis of EST libraries of the transpolyisoprene producing plant, *Eucommia ulmoides* Oliver[J]. *Planta*, 2012, 236(5): 1405.
- [4] Karine B, Yannick E, Alain D, *et al.* Isopentenyl diphosphate isomerase: a checkpoint to isoprenoid biosynthesis[J]. *Biochimie*. 2012, 94 (8): 1621.
- [5] Nakamura K, Mori F, Tanji K, *et al.* Isopentenyl diphosphate isomerase, a cholesterol synthesizing enzyme, is localized in Lewy bodies[J]. *Neuropathology*, 2015, 35, 432.
- [6] Campbell M, Hahn F M, Poulter C D, *et al.* Analysis of the isopentenyl diphosphate isomerase gene family from *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant molecular biology*, 1997, 36(2): 323.
- [7] Pan X, Chen M, Liu Y, *et al.* A new isopentenyl diphosphate isomerase gene from *Camptotheca acuminata*: Cloning, characterization and functional expression in *Escherichia coli*; Full length research paper [J]. *DNA Sequence*, 2008, 19(2): 98.
- [8] Sun J, Zhang Y Y, Liu H, *et al.* A novel cytoplasmic isopentenyl diphosphate isomerase gene from tomato (*Solanum lycopersicum*): Cloning, expression, and color complementation[J]. *Plant molecular biology reporter*, 2010, 28(3): 473.
- [9] 刘攀峰, 吴敏, 杜红岩. 杜仲 IPI 基因全长 cDNA 克隆与生物信息学分析[J]. *经济林研究*, 2014, 32 (1): 27-33.
- [10] 申甜, 邱飞, 陈敏, 等. 曼地亚红豆杉 IPI 基因克隆与功能鉴定[J]. *药学报*, 2015, 50(5): 621.
- [11] Wei L, Yin L, Hu X, *et al.* A novel chloroplastic isopentenyl diphosphate isomerase gene from *Jatropha curcas*: Cloning, characterization and subcellular localization[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2014, 17(6): 296.
- [12] Llave C, Kasschau K D, Carrington J C. Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97 (24):13401.
- [13] Jefferson RA, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. *The EMBO journal*, 1987, 6 (13): 3901.
- [14] Gao W, Sun H X, Xiao H, *et al.* Combining metabolomics and transcriptomics to characterize tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 73.
- [15] Wang Y, Qiu C, Zhang F, *et al.* Molecular cloning, expression profiling and functional analyses of a cDNA encoding isopentenyl diphosphate isomerase from *Gossypium barbadense* [J]. *Bioscience reports*, 2009, 29: 111.